

中药胃康宁对实验性胃癌 PCNA、p53 蛋白表达的干预作用

余 谦¹, 李庆明², 吴伟康², 曾 敬³

(中山医科大学 1. 孙逸仙纪念医院中医科; 2. 中西医结合研究所; 3. 病理教研室, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】了解胃康宁对大鼠实验性胃癌的防治作用及其可能的机制。【方法】Wistar 雄性大白鼠 50 只, 用 *N*-甲基-*N*'-亚硝基-*N*-硝基胍(MNNG)限期饲养法诱导大鼠腺胃发生腺癌, 大鼠分为三组: 阳性对照组、胃康宁 1 组(WKN 1, 防癌模型)、胃康宁 2 组(WKN 2, 治癌模型), 用光镜、电镜观察大鼠胃粘膜细胞恶性表型, 用免疫组化法观察增殖细胞核抗原(PCNA)、突变型 p53 蛋白表达。【结果】胃康宁能阻止大鼠胃粘膜细胞核异形性、胞核浓染、核浆比增大等恶性表型, 能降低 PCNA 和突变型 p53 蛋白表达(与对照组比较, WKN 1 组 $P < 0.001$, WKN 2 组 $P < 0.001$)。【结论】胃康宁对大鼠实验性胃癌具有良好的防治作用, 此作用与降低 PCNA、p53 蛋白表达有关。

关键词: 胃肿瘤/ 中医药疗法; p53 蛋白; 增殖细胞核抗原/ 药物作用; 胃康宁

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0038-05

The Reduced Expression of PCNA and p53 Protein in Experimental Rats Stomach Carcinoma by Traditional Chinese Herb "WEI KANG NING"

YU Qian¹, LI Qing-ming², WU Wei-kang², ZENG Jing³

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital,

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Combined with Western Medicine

3. Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To study the role and the possible mechanism of traditional Chinese herb WEI KANG NING (WKN) in the prevention and treatment on the experimental stomach carcinoma of rat. 【Methods】Adenocarcinoma of adenoid stomach induced by *N*-methyl-*N*'-nitroso-*N*-nitroguanidine(MNNG) in 50 male Wistar rats were divided into 3 groups: positive control group, WKN 1 group(show its preventing effect) and WKN 2 group(show its therapeutic effect). The changes of malignant phenotype of rat stomach epithelial cell were observed by light microscope and electron microscope; the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and mutant p53 protein were studied with immunohistochemistry. 【Results】Traditional Chinese herb WKN can inhibit the malignant phenotype of stomach epithelial cell such as heteromorphism, heteropyknosis and increasing of nucleus/plasma ratio, reduce the expression of PCNA and mutant p53 protein (two groups compared with control group, both $P < 0.001$). 【Conclusion】WKN has a good role on the prevention and treatment on experimental rat stomach carcinoma, this role is associated with the reduction of PCNA and p53 protein.

Key words: stomach neoplasms/ TCM therapy; protein p53; proliferating cell nuclear antigen/ drug effect; Wei Kang Ning

收稿日期: 2000-04-18

基金项目: 广东省中医药管理局基金资助项目(99536)

作者简介: 余 谦(1963-), 男, 四川遂宁人; 成都中医药大学中医内科学博士(1994-1997); 中山医科大学中西医结合研究所博士后(1997-1999), 现在孙逸仙纪念医院中医科工作。

胃癌是高发病率的消化道肿瘤,我国胃癌的死亡率也居各种恶性肿瘤死亡率之首。近年来,有关胃癌发生、发展的分子生物学研究显示,胃癌的形成是多个原癌基因激活和抑癌基因失活所累积起来的多步骤过程。p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因,突变型 p53 基因在丧失野生型抑癌功能的同时还具有致癌作用,成为癌基因,在胃癌组织中也常呈高表达,对胃癌发生、发展起着活跃的促进作用。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种细胞核蛋白质,与细胞增殖状态明显相关,其异常表达也与胃癌的形成呈正相关。目前有关药物防治胃癌的效果尚不理想,开展中医药防治胃癌的研究工作很有意义。中医学认为,胃癌的发生、发展过程与气郁、痰积、脾虚、瘀毒等病理因素密切相关,与此相应,本研究以具有健脾化痰、清热解毒、理气活血、消瘀散结功效的中药复方胃康宁开展防治大鼠实验性胃癌的研究,在细胞学水平观察中药阻止胃粘膜细胞恶性表型及促进恶变的胃粘膜细胞逆转等作用,在分子生物学水平观察与胃癌发生发展过程密切相关的 PCNA、突变型 p53 蛋白(以下统称 p53 蛋白)表达及中药的干预作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及试剂

选用健康 Wistar 雄性大白鼠 50 只,清洁级,2~3 月龄,体重 120~140 g,由中山医科大学实验动物中心提供(广东省实验动物监测所检证字 98A018)。N-甲基 N'-亚硝基 N-硝基胍(MNNG)由美国 Fluka 公司出品,批号:327080/1493,为淡黄色结晶品,4℃避光保存。先以蒸馏水配成 1 g/L 的贮存液,用时以自来水稀释成 100 mg/L,装入涂有黑漆的饮水瓶中,供大鼠自由饮用。贮存液每 5 d 配一次。全部配制过程均需避光。胃康宁由党参、茯苓、半枝莲、田七等 11 味中药组成,功效健脾化痰、清热解毒、理气活血、消瘀散结。预先将胃康宁制成生药浓度为 1 000 g/L 的药液,加防腐剂苯甲酸(0.1 g/L)、4℃冷藏保存,供大鼠灌胃之用。

1.2 动物分组

造模采用 MNNG 限期给药饲养法:每日自由饮用浓度为 100 g/L 的 MNNG 水溶液,24 周后,再予饮用自来水 16 周,实验时间共计 40 周。实验

动物共分三组:①阳性对照组:20 只, MNNG 限期给药饲养法。实验过程中自然死亡 3 只,余 17 只。②胃康宁 1 组(WKN 1):15 只, MNNG 限期给药饲养法加全程 40 周、每日依体重灌用胃康宁药液 10 mL/kg。此组显示胃康宁预防胃癌的效应。实验中 3 只死亡,余 12 只。③胃康宁 2 组(WKN 2):15 只, MNNG 限期给药饲养法加后 16 周、每日依体重灌用胃康宁药液 10 mL/kg。实验中 4 只自然死亡,余 11 只。按文献报道, MNNG 饲喂大鼠 20 周时大鼠腺胃已有腺癌样增生,胃粘膜细胞的恶性表型已经显现^[1],此时投予中药胃康宁,意在逆转胃粘膜细胞的恶性表型,显示其治疗胃癌的效应。

1998 年 5 月 25 日开始进行实验动物饲养,3 组分笼普通颗粒饲养,购处同前。

1.3 取材及观察

至 1999 年 3 月 25 日即饲养期的第 40 周末同时处死 3 组大鼠。取材时,先予灌注固定:经左心室穿刺至主动脉,用生理盐水 0.1 L 快冲血管床,用含 40 g/L 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4, 4℃)经升主动脉灌注,时间约 1h;然后剖腹取胃,沿胃大弯切开,生理盐水洗净,剪除前胃,将腺胃展平,暴露粘膜面;在粘膜面上有颜色异常和粟粒状结节处,连同其周围组织行条形切割,大小约 15 mm×2 mm。连续取多条组织,分置两处:置于 25 g/L 戊二醛(磷酸缓冲液配制) 4℃固定 1~2 h,送电镜室行电镜检查;置于 40 g/L 多聚甲醛固定 12 h,再入 200 g/L 蔗糖 PBS 液 24 h,取出,石蜡包埋,切片后行病理检查(HE 染色)及 PCNA、p53 蛋白检测(免疫组化法)。

1.4 统计方法

统计学处理采用方差分析、两两比较法;如果数据经过方差齐性检验为方差不齐,则采用两两比较 Tamhane 法进行显著性检验;否则采用两两比较 LSD 法进行显著性检验。规定 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有高度显著性差异(由中山医科大学统计学教研室采用 SPSS for Windows 7.0 版统计软件进行统计学处理)。

2 结 果

2.1 大鼠腺胃肉眼观察

阳性对照组粘膜面的颜色异常和粟粒状结节较为多见(12/17, 71%); WKN 2 组粘膜面亦有颜

色异常和粟粒状结节,但不多见(5/11, 45%); WKN1 组粘膜面未见有粟粒状结节,颜色异常亦少见(1/12, 8%)。经 χ^2 检验,3 组间有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 病理检查

正常组大鼠胃粘膜上皮细胞连接完整,腺管排列整齐;上皮细胞圆形,大小正常;细胞核圆形,染色正常;核浆比正常。WKN1 组大鼠胃粘膜上皮细胞连接比较完整,腺管排列整齐;上皮细胞圆形,大小正常;细胞核圆形,染色正常;核浆比正常。WKN 2 组大鼠胃粘膜上皮细胞连接比较完整,腺管排列比较整齐;上皮细胞圆形,大小接近正常;细胞核圆形,染色基本正常;核浆比基本正常。对照组大鼠胃粘膜上皮细胞的正常连接缺如,腺管排列紊乱;上皮细胞大小形状不一;细胞核异形性,胞核浓染;核浆比增大;癌细胞向肌层浸润。

2.3 电镜观察

正常组大鼠胃粘膜组织中主细胞、壁细胞及内分泌细胞清晰可见,大小、形态正常,细胞结构正常。WKN 1 组大鼠胃粘膜组织中,腺腔完整,细胞

分化良好,偶见未分化细胞,却呈现细胞凋亡改变。WKN 2 组大鼠胃粘膜组织中细胞量较多,核异形性。对照组大鼠胃粘膜组织中细胞数明显增多,细胞小,分化程度低,核浓染,核异形性,腺腔不明显,细胞排列不规整,形态各异。

2.4 PCNA 表达

将所制切片在光学显微镜低倍镜下观察,以细胞核呈现明确的棕黄色颗粒状染色为阳性细胞,细胞核蓝染的细胞为苏木素复染的阴性细胞,计数方法是在镜下选择均匀视野,循序在 100 个细胞中计数阳性细胞所占的个数。结果进行统计学处理。结果表明:WKN 1 组和 WKN 2 组的 PCNA 表达量均较对照组明显减少(图 1),且有高度显著性差异($P<0.001$);WKN 1 组的 PCNA 表达量亦较 WKN 2 组明显减少,两组间同样存在高度显著性差异($P<0.001$)。表明胃康宁具有显著抑制 PCNA 表达的效应;对于此效应,全程 40 周给予胃康宁组(WKN 1)优于后半程 16 周给予胃康宁组(WKN 2 组),详见表 1。

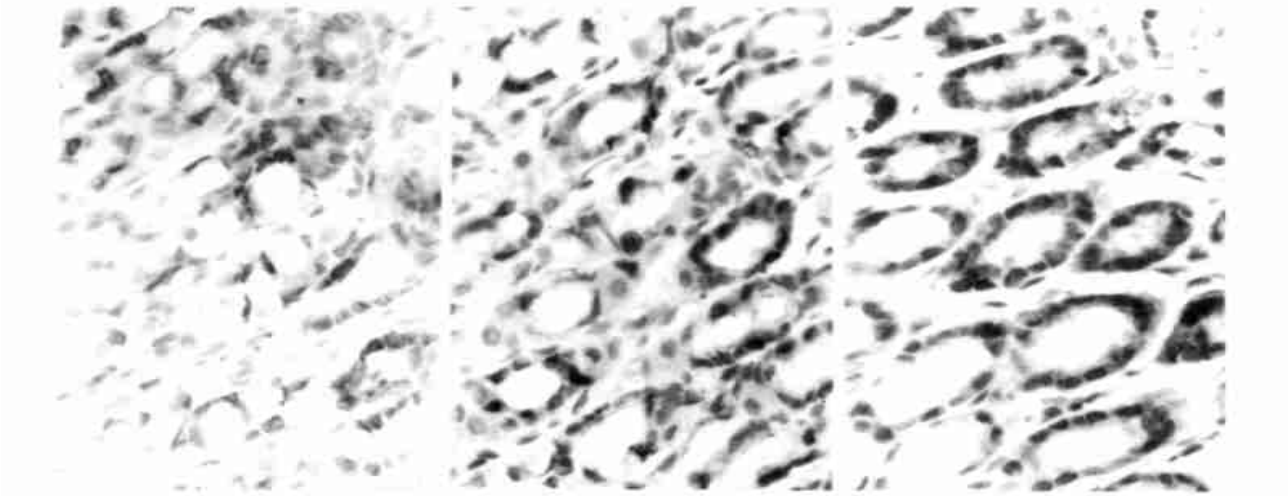


图 1 PCNA 在细胞核中的表达

Fig. 1 PCNA expression in cell nuclei

Left: WKN 1 group; Middle: WKN 2 group; Right: control group; $\times 400$

表 1 大鼠胃粘膜细胞 PCNA 的表达
Table 1 Expression of PCNA in the gastric cells of rats ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	n	PCNA
WKN 1	12	4.2 $\pm$ 1.6 ¹⁾²⁾
WKN 2	11	13.9 $\pm$ 3.0 ¹⁾
Control	17	35.1 $\pm$ 5.3

1) Compare with control, $P<0.001$; 2) Compare with WKN 2, $P<0.001$

2.5 p53 蛋白表达

结果判定:以细胞浆呈现明确的棕黄色颗粒状染色为阳性反应,并以此为目标进行真彩色图像分析处理(德国 KONTRON IBAS 2.5 版全自动图像分析系统),获得定量数据。先用光学显微镜低倍镜选择胃组织粘膜层的良好视野区域,再用高倍镜在此区域中均衡选择 5 个视野进行颜色目标定量

化, 所得数的平均值代表 1 只大鼠胃粘膜组织细胞 p53 蛋白表达量(定量单位: 面积 μm^2)。结果表明: WKN 1 组和 WKN 2 组的 p53 表达量均较对照组明显减少, 且有高度显著性差异 ($P < 0.001$); WKN 1 组的 p53 表达量亦较 WKN 2 组的明显减

少(图 2), 两组间同样存在显著性差异 ($P < 0.05$)。表明胃康宁具有显著抑制 p53 异常表达的效应; 对于此效应, 全程 40 周给予胃康宁组(WKN 1)优于后半程 16 周给予胃康宁组(WKN 2 组), 详见表 2。

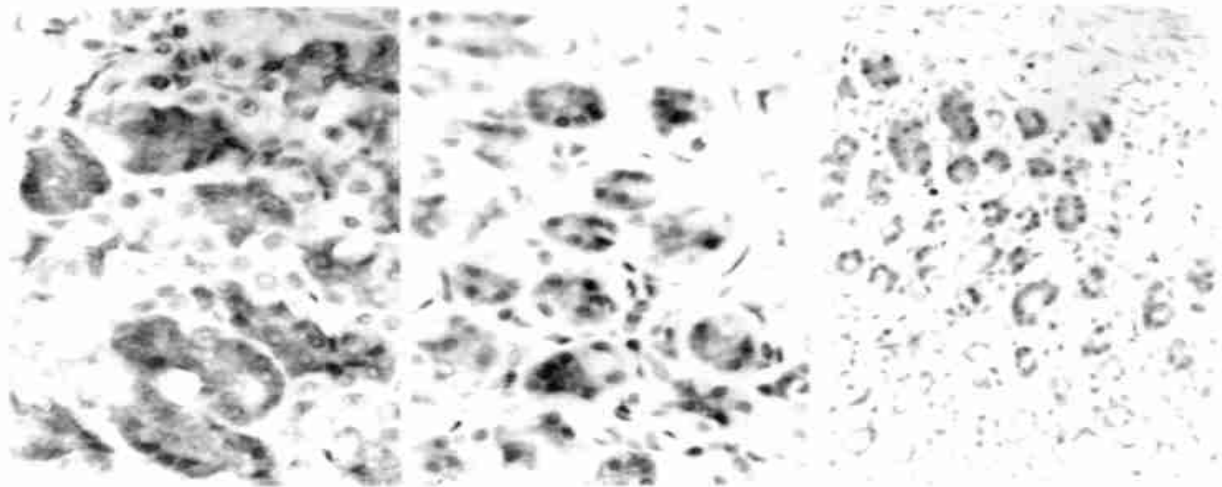


图 2 p53 蛋白在胞核中的表达
Fig.2 p53 positive cell nuclei is localized by a yellow-orange color
Left: WKN 1 group; Middle: WKN 2 group Right: control group; $\times 400$

表 2 大鼠胃粘膜细胞 p53 蛋白表达		
Table 2	Expression of p53 protein in the gastric cells of rats	($\bar{x} \pm s$)
Groups	<i>n</i>	p53 (μm^2)
WKN 1	12	$2.2 \pm 1.5^{1), 2)}$
WKN 2	11	$3.5 \pm 1.5^1)$
Control	17	6.3 ± 3.4

1) Compare with control, $P < 0.001$; 2) Compare with WKN 2, $P < 0.05$

3 讨 论

3.1 胃康宁对大鼠实验性胃癌的防治作用

恶性肿瘤是机体局部组织细胞在各种内部和外界的致癌因子长期作用下, 逐渐发生持续性异常增生所形成的新的生长物或新生物, 它是由正常细胞获得了新的生物学遗传特性转化而来, 具有自主性、去分化性和可移植性。恶性肿瘤常导致局部正常组织结构破坏, 组织恶性表型, 包括细胞异型、细胞核增大、核分裂相、核浆比例增大等^[4]。

本研究采用 MNNG 限期饲喂法诱导 Wistar

雄性大鼠生成腺胃腺癌, 经病理切片检查, 符合癌变特征。但在给予中药胃康宁组, 情况有所不同, 表明胃康宁对大鼠实验诱导性胃癌的发生有不同程度的对抗作用。WKN 1 组的结果说明中药胃康宁具有良好的抑制大鼠胃粘膜细胞恶性表型的作用, WKN 2 组的结果说明中药胃康宁具有一定的逆转胃粘膜细胞恶性表型作用, 显示中药胃康宁对大鼠实验性胃癌对抗效应的优势突出表现在防癌与治癌相结合上, 其单纯的治疗效应在一定程度上存在, 但其预防胃癌生成的作用却也显而易见。

3.2 PCNA 表达及中药干预的意义

PCNA 是存在于细胞核内的一种蛋白质, 即 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 与 DNA 的复制密切相关, 它对细胞由 G1 期向 S 期过渡起着重要的调节作用, 与肿瘤细胞的增殖密切相关^[3, 4]。在有关胃癌的研究中发现, PCNA 表达与胃癌的浸润及转移密切相关^[3, 5, 6]。本研究的造模组大鼠胃粘膜细胞中的 PCNA 呈现高表达, 说明胃粘膜细胞增殖过度旺盛, 形成细胞恶变的特点。本研究结果表明在诱导大鼠实验性胃癌形成的过程中, 预防性投予中药胃康宁能使大鼠胃粘膜细胞增殖状态维持正常或

接近正常状态,能有效阻止胃粘膜上皮细胞的恶性表型。

3.3 p53 蛋白表达及中药干预的意义

突变型 p53 蛋白是一个与胃癌高度相关的癌蛋白,在早期胃癌及进展期胃癌中均能检出其表达, Uchino 等应用免疫组化法检测了 149 例胃癌胃镜活检组织 p53 蛋白, 结果在 34% 的进展期胃癌和 22% 的早期胃癌中, 细胞核显示阳性反应, 而非肿瘤细胞未被标记。一些报告认为, p53 蛋白的阳性表达与胃癌的恶性程度相关; 有研究认为, p53 基因突变还与胃癌的转移及不良的预后有关; 有研究观察到, 用免疫组化法检测胃癌组织中突变型 p53 蛋白的阳性表达可分为胞浆型、核型以及全细胞型, 胞浆型与胃癌高分化有关, 核型与胃癌低分化有关^[7~10]。

本研究中, 造模组大鼠胃组织的 p53 蛋白呈现高表达, 在给予中药胃康宁组中, 全程(40 周)给予胃康宁组(WKN 1)的大鼠胃组织 p53 蛋白呈现较低程度表达, 表明预防性给予中药能较好防止在诱癌环境中胃粘膜上皮细胞中的 p53 基因成为被激活的突变型 p53 癌基因; 后半程(16 周)给予胃康宁组的大鼠(WKN 2)胃组织 p53 蛋白呈现中等程度表达, 表明治疗性给予中药具有一定的抑制 p53 蛋白表达的作用, 并通过抑制 p53 蛋白的表达逆转胃粘膜细胞的恶性表型, 从而减缓胃癌的发生, 产生一定的治疗作用。

此外, 许多研究认为在组织恶变过程中 p53 蛋白与 PCNA 之间存在着密切的正相关, 在胃癌亦是^[11, 12]。同样, 作为核内转入因子的突变型 p53 基因由于激活了某些细胞增殖相关基因的表达功能, 促进细胞增殖, 从而使 PCNA 呈现高表达。本研究在观察 p53 蛋白表达的同时也观察了 PCNA 的表达, 同样观察到两者之间密切而同步的关系。一方面, PCNA 与细胞增殖相关, 恶性肿瘤重要的生物学特征之一就在于组织细胞自主性增殖、生长; 而另一方面, p53 基因的突变又与组织细胞恶变有关, 因此, 在突变型 p53 基因蛋白表达与 PCNA 表达的两之间似乎存在着前后因果的关系, 这与肿瘤发生、发展过程中存在的众多而复杂的机

制一样, 进一步的明确和探明将有助于对胃癌发生、发展过程的认识。

参考文献:

- [1] 张忠兵, 王晓怀. 胃癌的病因学研究. 见: 张学庸. 胃癌的基础研究与临床[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 3.
- [2] 刘树范, 周彬. 肿瘤的细胞诊断学. 见: 刘复生, 刘彤华. 肿瘤病理学[M]. 北京: 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1997. 85~86.
- [3] 戴林. 增殖细胞核抗原与胃癌[J]. 国外医学·消化系统疾病分册, 1996, 16(1): 3.
- [4] Shou W, Gregory G H, David B. *et al*. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases control DNA replication by interaction with PCNA[J]. Nature, 1994, 349(16): 574.
- [5] 孙梅, 周丽红, 陈立平. p53 蛋白、增殖细胞核抗原及胎盘型谷胱甘肽 S 转移酶在胃癌中的表达及其意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 1998, 7(1): 34.
- [6] 刘斌, 卢放根, 霍继荣. 不同组织学类型胃癌细胞 PCNA 表达的分析[J]. 中国现代医学杂志, 1996, 6(6): 39.
- [7] 王淑真, 张海萍, 庄严阵, 等. 胃癌中 p53、p21 蛋白表达和 PCNA 免疫组化及临床病理意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1998, 5(1): 22.
- [8] 魏子白, 张谦, 吴云林, 等. 活组织 p53、c-erbB-2 和 nm23 蛋白检测对胃癌诊断价值[J]. 中华消化内镜杂志, 1997, 14(5): 291.
- [9] 魏子白, 吴云林, 翟祖康等. 胃癌 p53、c-erbB-2 和 nm23 癌蛋白的免疫组织化学研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(5): 378.
- [10] 张声, 叶圣华, 林华. p53 和 p21 过表达与胃癌淋巴转移呈正相关[J]. 中国肿瘤临床, 1996, 23(9): 639.
- [11] 杨竹林, 李永国, 黄生, 等. 胃癌组织中 PCNA 评分和 Be1-2、p53 蛋白表达及相互关系[J]. 中国肿瘤临床, 1997, 24(11): 811.
- [12] 冯福才, 黄文, 王继德, 等. 胃癌组织 p53 蛋白和 PCNA 的表达意义[J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(10): 624.

(编辑 刘清海)